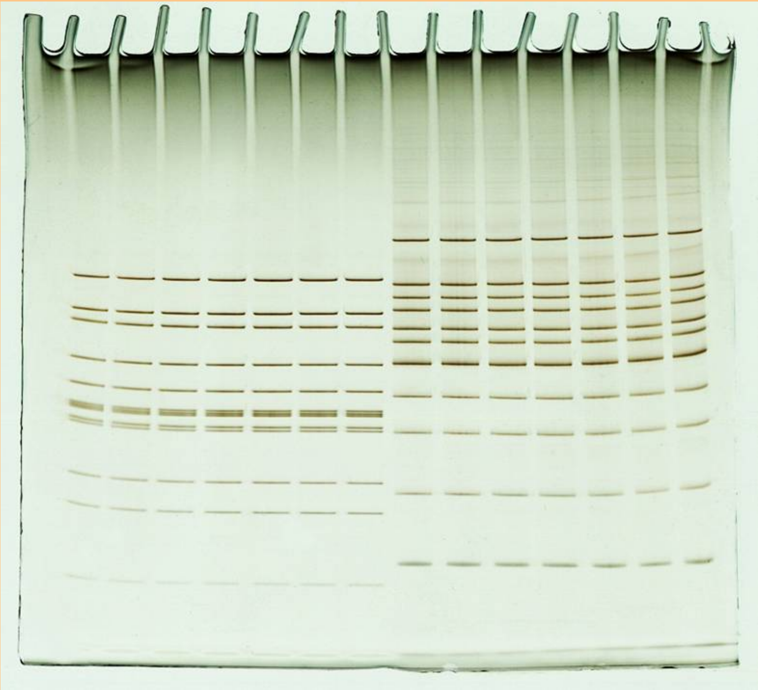
ATTO Technical Manual

AE-1360 型 *EzStain Silver* による

銀染色のコツ



ゲル　：e･パジェル E-T12.5L
試料　：φX174-HincⅡdigests 40ng/ウェル
　　　　100bp DNA ladder　125ng/ウェル
電極液：トリス･グリシン
通電圧：20mA/枚
銀染色：AE-1360型*EzStain Silver*

銀染色ならCBB染色･EtBr染色のの10倍以上の感度があります。
発色開始まで約60分です。
銀染色はタンパク質(MS)･ＤＮＡの検出に利用できます。

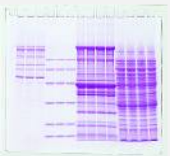
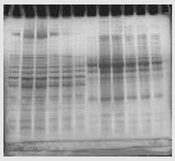
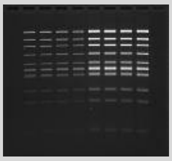
ATTO Corporation
3-2-2 Motoasakusa Taitou-ku Tokyo 〒111-0041
TEL 03-5827-4861　FAX 03-5827-6647
URL http://www.atto.co.jp/

ATTO Corporation (Osaka)
2-8-1 Higashi-Tenman Kita-ku Osaka City
〒530-0044
TEL 06-6136-1421　FAX 06-6365-3625

銀染色の

Q1. 銀染色って、どんなもの?	A1. DNAやタンパク質を電気泳動後、銀イオンを用いて検出する技法です。また、この小冊子ではこの方法に限定して説明します。
Q2. 銀染色法の原理は?	A2. 電気泳動分離後、ゲル中に銀イオン溶液を浸透させ、分離された成分と銀イオンを結合させせます。次いで、銀イオンを還元すると発色し銀染色像と成ります。銀染色と言っても銀色とはならず、黒味がかった微妙な色調と成ります。
Q3. 銀染色ってどこがいいの?	A3. 銀染色法は高感度、短時間で検出できます。特殊な装置は必要なく、振とう器があればゲルを染色し、これを保存できます。数種の試薬や銀染色キットを用いる事で染色可能です。総合的に優れた染色法と言えます。

銀染色法と他の染色法との比較

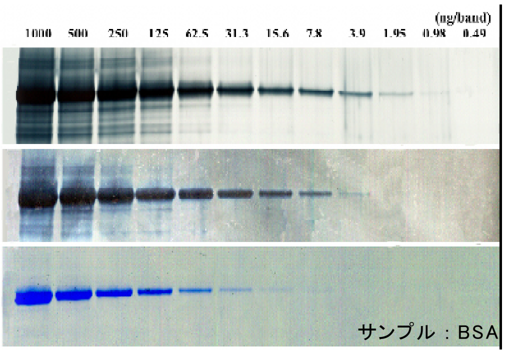
	①銀染色	②CBB染色	③リバース染色	④蛍光染色
長所	高感度、短時間、特殊な装置不要、少数の試薬かキット使用、DNA and orタンパク質自体を染色可能。	一定時間以上染料(色素)液に浸漬し、不要色素を脱色するのみであり、操作は比較的容易。	比較的操作容易、CBBより高感度、短時間で終了。	操作容易:一定時間浸けた後、洗浄するのみで終了。高感度・定量性に優れる。
ゲル乾燥保存	○	○	×	×
短所	各反応工程を要し、比較的正確に時間・処方を守る必要がある。また、廃液中の銀イオンを処理する必要がある。	最も一般的に電気泳動像を得る技法だが、やや低感度である。タンパク質試料に対応し、DNAには対応せず。	ゲル乾燥と共に電気泳動像は消失する故、画像処理か写真撮影を要する。金属イオンを別途処理要する。	励起光源を必要とし、画像撮影装置などが必要。浸漬時間は比較的長く、また高感度な蛍光色素は比較的高額である。DNA/タンパク質共用品がない。
ﾀﾝﾊﾟｸ質感度	数ng/バンド	約10ng～1μg/バンド	数10ng/バンド	約10ng/バンド
DNA感度	数10pg/バンド	－	－	約0. 1ng/バンド
定量性	×	△	×	○
染色像				

各染色法の検出感度比較データ

AE-1360 型 *EzStain Silver*
イージーステイン・シルバー

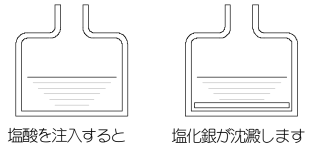
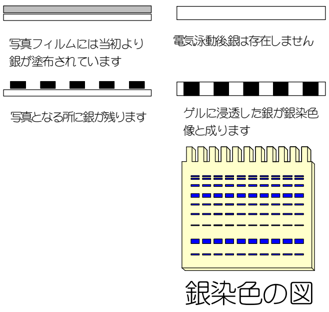
AE-1310 型 *EzStain Reverse*
イージーステイン・リバース

AE-1340 型 *EzStain AQua*
イージーステイン・アクア

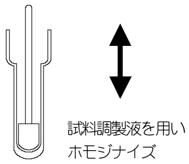
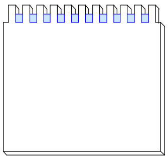
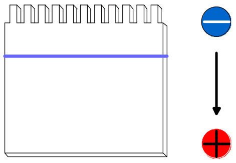
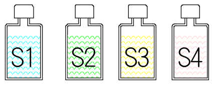
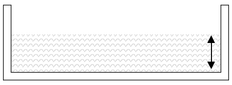
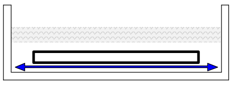
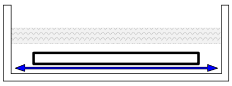


Q & A

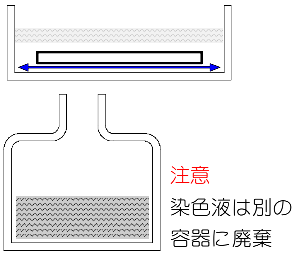
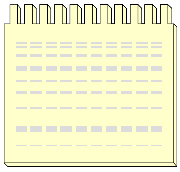
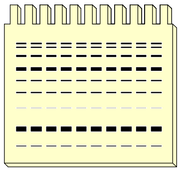
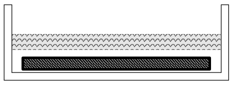
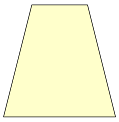
Q4. それで、結局の所、銀染色法が一番良いという事か?	A4. 銀染色法は各成分に対し、非特異的に高感度に染色する技法です。 操作性も良好であり、総合的に優れた染色法といえます。但し、特異的染色と濃度定量は不得手です。
Q5. 銀染色技法も多種多様な方法があるそうだが・・・	A5. 銀染色法は僅かな変法まで含めると、無数にあると言えます。 各状況により最適な銀染色法がありますが、各々を試行錯誤して選定する事は困難です。その為、汎用的な銀染色キットが利用されています。
Q6. ***EzStain Silver*** も、コツとか工夫する点があるでは・・・?	A6. コツや工夫よりもまず取扱説明書の通りにご使用下さい。***EzStain Silver*** は感度や操作性が最良の結果となるように作製されています。 独自に変法なされると良好な結果を得られない場合があります。

Q7. 銀染色後の銀イオン廃液はどのように処理するのか?		A7. 銀イオン廃液に塩素イオン(HCl、NaCl)を加え塩化銀として沈澱させます。上澄みは(NaClを加えた場合は中和後)、希釈して排液し、塩化銀の沈澱は濾過後、別途処理(専門業者への引渡し等)します。
Q8. 銀染色と写真現像と違うのか?		A8. 銀染色と写真現像の類似点は銀イオンを還元して金属銀とする点です。写真フィルムには予め銀が塗布されており、現像・定着により不要の銀を除去して写真像とします。しかし銀染色の場合、当初より銀はなく、電気泳動後銀イオンをゲル中に浸透させタンパク質やDNAと結合させた後、銀イオンを還元して、銀染色像とします。銀染色というよりも、「銀メッキ」と言ったほうが正しいかも知れません。
Q9. ゲル内の尿素やグリセロールの影響を受けるのか?	電気泳動後のゲル固定時間を30分間とします。	A9. 尿素やグリセロールがゲルに含まれていると、銀染色され難く成ります。その為、本来の固定時間10分を30分間に延長します。
Q10. DNA試料や泳動バッファーにEDTAが入っていると影響を受けるか?	取扱説明書通りに操作すれば、殆ど影響有りません。	A10. EDTAの影響は有りますが、固定・洗浄過程で殆ど除去されます。
Q11. 試料溶液中にDTTが入っていると影響を受けるか?	取扱説明書に記載のとおり操作してください。	A11. DTTが含まれているとその周囲のバックグランドが染まらないことがあります。洗浄をメタノール溶液にすることで除去されます。
Q12. 検出後、質量分析(MS)を行なうが問題ないか?	使用可能です。	A12. 銀染色処方にグルタルアルデヒドが含まれていると質量分析結果に影響を及ぼす事が有ります。***EzStain Silver***には含まれていません。
Q13. 染色後の銀を取りたい(脱色したい)が可能か?	ＫＩ溶液で洗浄することで再溶解可能です。	A13. 6M KI(ヨウ化カリウム)溶液で色が抜けるまで脱色します。液交換3回/2時間ぐらいで透明になります。

AE-1360型 *EzStain Silver*

工程名	図解	使用方法要点
1. 電気泳動 ①試料調製		1. 電気泳動 ①試料調製は電気泳動の全てを決定します。試料調製が不適切であれば、良好な電気泳動像は全く期待できません。試料調製にはアトー㈱AE-1430型サンプル調製用バッファーキット品***EzApply***を推奨致します。
②電気泳動試料添加		②試料添加量 幅4.2mmのウェル(アトー㈱eパジェル14検体用など)ならばDNAで5ng程度、タンパク質で500ng程度の範囲内とします。
③電気泳動・通電		③取扱説明書通りに操作し、電気泳動します。
2. 銀染色温度に注意		2. 環境温度25℃±3で操作します。 実験室の温度は一般に、この範囲内と想定しています。
3. 容器と試薬を準備し、溶液調製	***EzStainSilver***の各試薬(瓶) メタノール 50mL以上 酢酸 1mL以上 精製水 2L以上	3. 試薬準備、溶液調製 ①***EzStain Silver***一式 ②ゲルよりも一回り大きいプラスチック容器(台所用品　など透明ないし白色の蓋付容器が良好) ③特級メタノール50mL以上(固定液調製用) ④酢酸1mL以上　(停止液調製用) ⑤精製水(蒸留水以上)2L以上
4. 一般的注意点 工程時間・手袋	実験用手袋着用厳守	4. 一般的注意事項 取扱説明書通りに実験して下さい。***EzStain Silver***は最短時間・最小作業で最良の銀線染色像を得るように作製されていますので、工程時間はできるだけ正確に守って下さい。
5. 銀染色操作 ①電気泳動終了前に、『固定液』を準備します。	 ゲルが十分沈む深さとします	5. 銀染色操作 ①『固定液』で分離成分をゲルに固定し、且つ銀染色に不要な成分を除去します。ミニゲルより一回り大きい程度の容器なら、80～100mL注入すればゲルが十分沈む深さとなります。
②電気泳動後のゲルを『固定液』に入れ、10分間振とうし排液します。	 分離成分を固定	②振とう強度(速度)は強すぎるとゲルを損ない、弱すぎるとゲルに均等に溶液が浸透しません。ゲルがトレイの底に付着せずゆっくり滑り動いている程度が最適です。 シーソー式や水平往復式の振とう器の使用を推奨します。
③精製水で10分間振とうしつつ3回洗浄します。 (試料溶液にDTTを含む場合はメタノール溶液を用います。)	 洗浄	③「精製水での洗浄」という工程は、一見特筆すべき工程では無いようですが、極めて重要な工程です。この工程でゲル内やゲル表面の不要な成分を洗浄除去します。この際、『精製水』が清浄でなかったり、洗浄不十分であると、電気泳動像の汚れと成ります。逆に長すぎると感度が落ちる場合があります。試料処理液にDTTを含む場合、バックグランドが染まり難い(むらになる)ことがあります。その際はメタノール溶液を用います。(詳細は取扱説明書参照)

使用方法の要点

④『染色液』中で5分間振とうし、排液します。但し、この溶液はそのまま下水に排液できません。		④固定液と同様に振とうします。『染色液』には銀イオンが含まれているので、そのまま下水に排液できません。別容器に移し塩素イオン(HCl、NaCl)を加え塩化銀として沈澱させます。HCLなら約150μL、NaClなら約100mg必要です。上澄みは(NaClは中和後)、希釈して排液し、塩化銀の沈澱は別途処理します。各施設、自治体等の指導に従って下さい。
⑤ゲル表面の過剰な銀イオンを除去します。 約30秒間でゲルに精製水を100mL注入・振とう・排液します。		⑤*EzStain Silver*での銀染色で最も繊細な工程です。 この工程を省略すると過剰な銀イオンを除去できず、良好な電気泳動像を得られません。精製水注入・振とう・排液終了までを約30秒間で行なって下さい。この時間を厳守しないと、必要な銀イオンは流れ去り、場合によっては電気泳動像が得られない場合もあります。 その後、直ちに、下記の『発色液』を注入します。
⑥『発色液』を注入し、30秒間振とうし、排液します。 共洗い操作です。		⑥上述⑤の操作終了後直ちに、『発色液』を注入し、30秒間振とうし迅速に排液します。この間、淡く銀染色像が出現する事がありますが、稀です。この工程により『発色液』への液交換を確実にします。
⑦再度『発色液』を注入し、適切な銀染色像となるまで振とうし、排液します。		⑦各状況により適切な銀染色像となるまでの時間は異なりますが、概略10～20分です。 **30分経過しても痕跡も出現しない場合、銀染色工程のいずれかが不調です。この場合、決してゲルを捨てず、この溶液に浸けたまま、翌日まで放置して下さい。背景は薄茶系となりますが、銀染色像は出現します。 ***それでも像が出現しない場合は、試料調製不良、添加量過少、など銀染色以前の操作に起因する可能性があります。
⑧『停止液』100mLを注入し、10分間振とうし、排液します。	酸性にする 	⑧適切な銀染色像となった後、上述『発色液』を排液し、『停止液』を注入します。銀染色に熟練してきたならば、適切な銀染色像となる一歩手前で、『停止液』に交換します。厳密には『停止液』に交換しても多少銀染色像(発色)が進行します。
⑨精製水100mLで5分間振とうし排液します。 もう一度繰り返します。		⑨『精製水』を用いて、停止液を洗います。この操作もう一度繰り返します。
⑩電気泳動像を記録します。 画像取込や写真撮影、乾燥後ゲル保存などです。		⑩ゲルを乾燥すると、不均一に収縮して、乾燥前の形状と多少異なります。その為、乾燥前に画像撮影などして記録します。
⑪ゲルを乾燥して記録保存する場合	 やや変形した乾燥ゲル(図は強調してあります)	⑪低濃度(7.5%以下)のゲルならば銀染色後、そのまま乾燥してもゲルに亀裂は殆ど生じませんが、それ以上のゲル濃度となると、亀裂が生じ易くなり、これを防ぐには、35%メタノール溶液に浸け、2～3回液交換した後、一夜浸漬すると、翌日ゲルは収縮して乾燥時の強度を増します。しかし、多少変形してしまいます。亀裂防止剤AE-3780型アンタイクラックの使用を推奨します。

銀染色キット *EzStain Silver* の特長

1. 型式・名称	AE-1360型 ***EzStain Silver***	Ezシリーズの銀染色キットです
2. 発色開始時間	60分後程度	操作開始から短時間(約60分後)で発色します。
3. 対応電気泳動法	各種電気泳動法に対応	ポリアクリルアミドゲルによる各種電気泳動方に対応します。 SDS-PAGE、native-、等電点-、二次元-電気泳動法などに対応。
4. 対応試料	タンパク質、DNA	タンパク質やDNA、或は両方同時に銀染色できます。
5. 感度	タンパク質: 数ng/バンド DNA: 数10pg/バンド	銀染色として十分な感度
6. 操作性	100倍希釈に統一	原液:精製水=1mL:100mLと100倍希釈に統一してある為、誤操作を防ぎ、且つ、メスシリンダーなど器具を単純化できます。
7. 臭気性成分不含	アンモニア含まず	成分にアンモニアを含まず、キット原液は殆ど無臭です。
8. 銀アミド生成せず	廃液に爆発性物質生成せず	爆発に関し配慮する必要はなく、負担軽減されます。
9. 少ない工程数	8工程数	各社キットと比較しても少ないといえます。
10. 質量分析対応	グルタルアルデヒド不含	銀染色後、質量分析(MS)に対応できます。
11. 銀染色像停止時期	緩やかな発色、約15分間で飽和	緩やかに発色しますから、銀染色停止時期に神経質になる必要はありません。 15～20分で電気泳動像は一定となります。
12. (S)SDS関連成分	硝酸銀、水酸化ナトリウム、ホルムアルデヒド	(S)SDSはアトー㈱ホームページに掲載。 http://www.atto.co.jp よりダウンロードください。
13. 価格	¥16,000/ミニゲル50枚	リーズナブル ¥320/ゲル

銀染色キット各社比較

(2013年各社カタログ表記に基づきます)

製品	アトー *EzStain silver*	B社	L社	T社	C社	W社	N社
感度 (ﾀﾝﾊﾟｸ質)	数ng	0.6～1.2ng	0.2～0.6ng	0.25ng	数ng	0.6ng	数ng
ｷｯﾄ内容	4	6	7	6	6	7	4
ｽﾃｯﾌﾟ数	8	3		9		9	9
時間	約60min	約120min	約120min	約40min	約60min	約70min	約80min
対応(ﾐﾆｹﾞﾙ)	50枚	40枚	20枚	20枚	10枚	20枚	20枚
価格	¥16,000	¥34,000	¥29,100	¥35,000	¥9,000	¥19,000	¥9,500
単価/ﾐﾆｹﾞﾙ	¥320	¥850	¥1,450	¥1,750	¥900	¥950	¥475
特徴	MS可、操作性、安価	アガロースも可	MS可	MS用	二重染色可	MS用	MS可、核酸不可

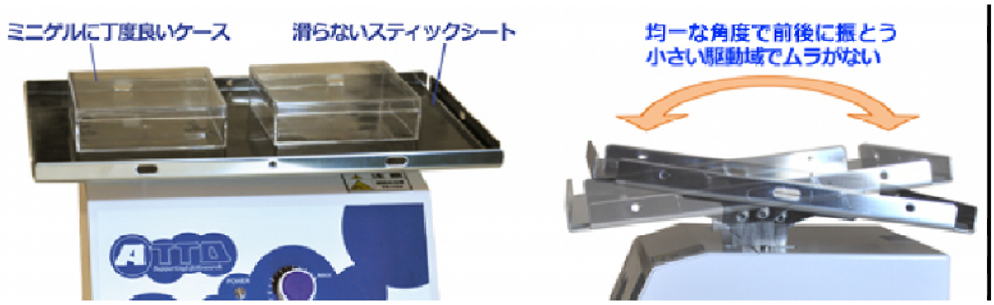
実験コストダウンをATTO高性能・高品質試薬で!

関　連　製　品

新型！振とうムラの無いシェーカー 誕生！

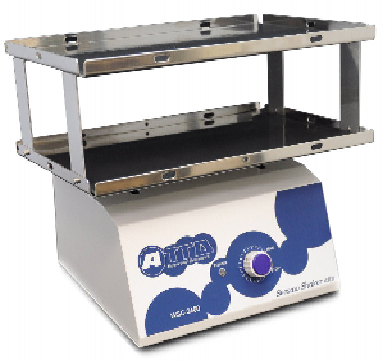
ゲルや膜 の　振とうの革命

新型の振とう装置 **SeesawShaker atto** **（シーソーシェーカー アトー）** は振とうムラの起きにくいメトロノーム様式です。前後に傾くことで振とう台のどこに置いても同じ角度で、 位置による溶液の動きの差を少なくし、 全体的に均一に溶液が動くように設計されています。



WSC-2400 SeesawShaker atto

仕様	WSC-2400 SeesawShaker atto シーソーシェーカー アトー
振とう方式	メトロノーム様振とう式　前後
振とう速度	0～48rpm　つまみによる調整
振とう角度	±8度
最大負荷量	3kg
使用環境温度	4～40℃
振とう台寸法	202mm×309mm　（ミニゲル約6枚分）
電源	100V 50/60Hz
付属品	スチロールケース （10×10cm 蓋付きトレイ） 2個



オプション　上段振とう台を設置

固定具でチューブ仕様

ケース6個を設置

コードNo	型式 ・ 名称	価格
2312200	WSC-2400 SeesawShaker atto シーソーシェーカー アトー	¥98,000
2312210	WSC-2400用上段振とう台	¥18,000
2312211	固定具 （フック付ゴム紐） 2本組	¥2,000
2312212	スティックシート 2枚組	¥4,000
2312213	スチロールケース （蓋付きゲル ・ 膜トレイ） 4個組	¥2,000

関　連　製　品

電気泳動関連試薬 「*Ez* シリーズ」

実験コストダウンをアトーの高性能・高品質試薬で！

タンパク質の電気泳動～検出、または泳動後のゲルから膜へのブロッティング（ウエスタンブロッティング）～検出、DNAの電気泳動をサポートします。

※詳細は別途カタログ・弊社 Web サイトをご参照ください。

用途	製品名	型式	商品コード	価格
タンパク質抽出キット	*EzRIPA Lysis kit* イージーリパライシスキット	WSE-7420	2332336	¥9,000
オルガネラ分画抽出キット	*EzSubcell Extract* イージーサブセルエクストラクト	WSE-7421	2332337	¥38,000
オルガネラ分画単離キット	*EzSubcell Fraction* イージーサブセルフラクション	WSE-7422	2332338	¥38,000
リン酸緩衝生理食塩溶液	*EzPBS(-)* イージーピービーエス	WSE-7430	2332380	¥5,000
SDS-PAGE 泳動用バッファー	*EzRun* イージーラン	AE-1410	2332310	¥4,800
SDS-PAGE高分離泳動用バッファー	*EzRun* C+ イージーランシープラス	AE-1412	2332320	¥12,000
トリス-トリシン 泳動用バッファー	*EzRun* T イージーランT	AE-1415	2332325	¥9,800
MOPS泳動 バッファー	*EzRun* MOPS イージーランMOPS	WSE-7065	2332326	¥7,500
トリス-グリシン バッファー	*EzRun* TG イージーランTG	WSE-7055	2332323	¥5,000
試料(SDS)処理液	*EzApply* イージーアプライ	AE-1430	2332330	¥6,800
2次元電気泳動用試料抽出・処理液	*EzApply2DKit* イージーアプライ2Dキット	AE-1435	2332335	¥20,000
DNAローディングバッファー	*EzApplyDNA* イージーアプライDNA	WSE-7040	2332394	¥5,000
タンパク質分子量マーカー	*EzStandard* イージースタンダード	AE-1440	2332340	¥9,800
同　2本組		AE-1440-2	2332345	¥19,000
タンパク質青色マーカー	*EzStandard PrestainBlue* イージースタンダード プレステインブルー	AE-1450	2332347	¥14,000
タンパク質有色マーカー	*EzProteinLadder* イージープロテインラダー	WSE-7020	2332346	¥20,000
CBB染色キット	*EzStain AQua* イージーステイン・アクア	AE-1340	2332370	¥9,800
リバース染色キット	*EzStain Reverse* イージーステイン・リバース	AE-1310	2332350	¥16,000
小容量用型遠心ろ過用品	アトプレップMF	AB-1171	3521370	¥20,000
銀染色キット	*EzStain Silver* イージーステイン・シルバー	AE-1360	2332360	¥16,000
タンパク質蛍光標識キット	*EzLabel FluoroNeo* イージーラベルフルオロネオ	WSE-7010	2332333	¥30,000
DNA蛍光染色剤	*EzFluoroStainDNA* イージーフロロステインステインDNA	WSE-7130	2332395	¥18,000
ウエスタンブロッティング溶液	*EzBlot* イージーブロット	AE-1460	2332600	¥12,000
高速ウエスタンブロッティング溶液	*EzFastBlot* イージーファストブロット	AE-1465	2332590	¥9,000
ブロッキング溶液（非タンパク質性）	*EzBlock Chemi* イージーブロック ケミ	AE-1475	2332615	¥9,000
ブロッキング溶液（BSA）	*EzBlock BSA* イージーブロック BSA	AE-1476	2332616	¥9,000
ブロッキング溶液（カゼイン）	*EzBlock CAS* イージーブロック キャス	AE-1477	2332617	¥9,000
洗浄用溶液(TBS溶液)	*EzTBS* イージーティービーエス	WSE-7230	2332625	¥5,000
界面活性剤（10%Tween溶液）	*EzTween* イージーツイーン	WSE-7235	2332626	¥2,600
HRP用発色基質	*EzWestBlue* イージーウエストブルー	AE-1490	2332630	¥12,000
HRP用発光基質	*EzWestLumiOne* イージーウエストルミ ワン	WSE-7110	2332632	¥9,500
HRP用発光基質（高感度）	*EzWestLumi plus* イージーウエストルミプラス	WSE-7120S	2332637	¥8,800
		WSE-7120L	2332638	¥28,500
抗体剥離剤（ストリッピング剤）	*EzReprobe* イージーリプローブ	WSE-7240	2332530	¥12,000
SDS除去試薬	*SDS-eliminant* SDS-エリミナント	AE-1390	2332390	¥14,000

2015/10/1

ATTO アトー株式会社

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス

主要製品
●DNA分析機器
●画像分析システム
●発光分析装置
●バイオ研究機器
●医療分析装置
●ペリスタポンプ
●クロマトグラフ
●電気泳動分析機器

■本　　社 〒111-0041東京都台東区元浅草3-2-2 ☎(03)5827-4861(代表) Ⓕ(03)5827-6647
◆技術サービス ☎(03)5827-4873(代表) Ⓕ(03)5827-4874
■技術開発センター 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 ☎(03)5818-7560(代表) Ⓕ(03)5818-7563
（東京都許可 医療機器製造業）
■大阪支店 〒530-0044大阪市北区東天満2-8-1 若杉センタービル別館 5F ☎(06)6136-1421(代表) Ⓕ(06)6356-3625

■URL http://www.atto.co.jp/